



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Antonio Barišić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

ODREĐIVANJE STRUKTURE VELIKIH MAKROMOLEKULSKIH KOMPLEKSA KRIO-ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

7. srpnja 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. ODREĐIVANJE STRUKTURE VELIKIH MAKROMOLEKULSKIH KOMPLEKSA KRIO-ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM	2
2.1. Povijesni osvrt	2
2.2. Razvoj tehnologije za krio-EM.....	5
2.2.1. <i>Direktni detektori elektrona (direct-electron detectors)</i>	<i>5</i>
2.2.2. <i>Napredak u obradi snimki u krio-EM.....</i>	<i>7</i>
2.3. Krio - elektronska mikroskopija - jednočestična analiza (Single-particle cryo-electron microscopy)	9
2.3.1. <i>Priprema uzorka za analizu</i>	<i>12</i>
2.3.2. <i>Prikupljanje slika i njihova obrada za krio-EM jednočestičnu analizu.....</i>	<i>16</i>
2.3.3. <i>CTF parametri.....</i>	<i>16</i>
2.3.4. <i>Biranje čestica za određivanje 3D strukture.....</i>	<i>17</i>
2.3.5. <i>Klasificiranje snimki</i>	<i>17</i>
2.3.6. <i>Određivanje početne strukture makromolekule</i>	<i>18</i>
2.3.7. <i>Mjerenje rezolucije i interpretacija 3D mapa.....</i>	<i>20</i>
2.4. Zaključak.....	21
§ 3. LITERATURNI IZVORI	XXII

§ Sažetak

Razvoj krio-elektronske mikroskopije krenuo je polako još prije otprilike 50 godina. Prva tehnika korištena još 70-tih je bila bojenje uzorka u negativu, da bi zatim znanstvenici Henderson i Unwin, kao i Taylor i Glaeser te Dubochet otkrili drugi način tako da se uzorak smrzne u amorfnom ledu. S vremenom je dolazilo do napretka tehnologije, od elektronskih mikroskopa preko softvera i kompjutorskih algoritama pa sve do detektora. Međutim potreba za napretkom nije stala do danas.

Krio-elektronska mikroskopija može se bazirati na uređenim 2D kristalima (elektronska kristalografija), stvaranju uređenih skupina α zavojnica (rekonstrukcija zavojnica), snimanju velikog broja homogenih, nasumično orijentiranih čestica (jednočestična analiza) ili uzimanju niza nagnutih tankih uzoraka (tomografija).

Broj struktura sa rezolucijom blizu atomske se u posljednjih 10 godina enormno povisio, odnosno pohranio u EMD (Electron Microscopy Data Base), isključivo zahvaljujući ovoj metodi. Glavna prednost same metode je što ne zahtjeva velike količine uzorka, nije potrebna kristalizacija istog kao ni potpuna homogenost. Kao krajnji rezultat dobije se struktura visoke rezolucije što pak strukturni biolozi ili biokemičari koriste i transliraju arhitekturu molekule u njenu funkciju.

Kao što je na početku navedeno, krio-elektronska mikroskopija i danas traži nove unaprijeđenja i pomiče granice mogućeg. Počevši od automatiziranog prikupljanja podataka, kamera koje snimaju uzorke, preko rešetki koje pomažu u redukciji kretanja uzorka prilikom indukcije snopom elektrona, pa sve do algoritama koji služe pri klasifikaciji snimki.

Manjak strukturne homogenosti uzoraka u krio-EM predstavlja limitirajući faktor u određivanju struktura visoke rezolucije. Nažalost, ne postoje prečaci za povećanje kvalitete uzorka, i ovaj korak predstavlja naporan laboratorijski proces koji može trajati i mjesecima prije nego uzorak bude spreman za analizu. Osim toga postoje biološke sustavi koji i kad su pročišćeni do homogenosti ostaju strukturno heterogeni zbog unutarnje dinamike samog sustava. Stoga su analize niske i srednje rezolucije ključne u shvaćanju i organizaciji takvih kompleksa, te izreka da ne trošimo čiste misli na prljave proteine ili razne biološke strukture u našem slučaju ovdje pada u vodu.

§ 1. UVOD

Jedna od glavnih zadaća molekularne biologije je shvaćanje kako makromolekularni kompleksi ispunjavaju svoje uloge u živućim stanicama. Strukturna biologija ima za cilj zaključiti kako takvi kompleksi funkcioniraju tako što određuje njihovu 3D strukturu. Upravo se ovom temom bavi ovaj rad - određivanjem 3D strukture makromolekulskih kompleksa.

Prošlo stoljeće je po mnogo čemu bilo revolucionarno, pa tako i u detekciji struktura molekula. Postoje razne tehnike otkrivanja 3D strukture od kojih je uvjerljivo najučestalija i najuspješnija kroz povijest bila kristalografija X-zraka. Pod uvjetom da se naš kompleks može kristalizirati, ova tehnika nam daje prikaze do atomske rezolucije te nije ograničena na samu veličinu kompleksa. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) ima za prednost što nam daje informacije o dinamici kompleksa te interakcijama unutar sustava, međutim ona joj je što je ograničena na manje komplekse mase manje od 40-50 kDa. Obje tehnike zahtjevaju veliku količinu čistog/pročišćenog uzorka (otprilike nekoliko miligrama).^{1,2}

Krio-elektronska mikroskopija relativno je novi član ove obitelji, ali polako i sigurno preuzima glavnu riječ u detekciji struktura. Na tome može zahvaliti ponajviše naglom napretku tehnologije koja ju je uvelike popularizirala i dala joj široku primjenu, od određivanja strukture pa do shvaćanja dinamike makromolekula.

Cilj ovog rada je da prikaže što je sve utjecalo na razvitak krio-elektronske mikroskopije i zašto ona danas predvodi tehnike u strukturnoj biologiji. Druga i puno bitnija stvar na koju će se rad bazirati je sami proces određivanja strukture neke makromolekule, od pripreme uzorka do interpretacije dobivene 3D mape. Bitno je napomenuti da pojam čestica ili jednočestična analiza ne predstavlja neku subatomsku česticu (proton, elektron, neutron), već neki jako mali dio molekule kojoj se određuje struktura.

Danas krio-elektronska mikroskopija uvelike olakšava shvaćanje mnogobrojnih makromolekulskih kompleksa, a ovaj rad će Vam objasniti i kako.

§ 2. ODREĐIVANJE STRUKTURE VELIKIH MAKROMOLEKULSKIH KOMPLEKSA KRIO-ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM

2.1. Povijesni osvrt

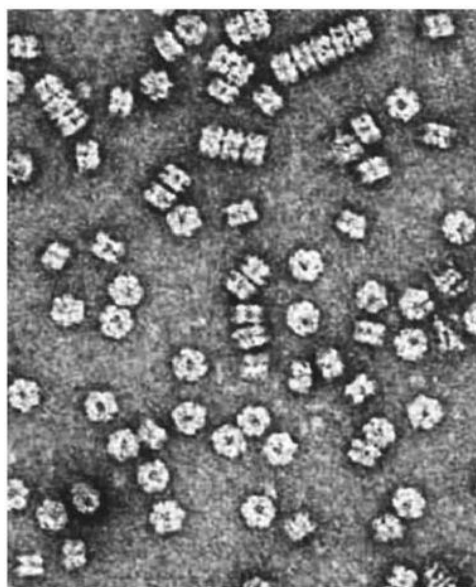
U ovom ću odlomku napraviti kratak povijesni osvrt na napredak krio-EM, tehnici koja ne zahtjeva velike količine uzorka (0,1 mg je dovoljan), ima manja ograničenja što se tiče čistoće uzorka te sami uzorak ne zahtjeva kristalizaciju.¹

EM (elektronska mikroskopija) bioloških uzoraka je prešla dalek put od razvoja prvih elektronskih mikroskopa sredinom 20. stoljeća. Uzimajući u obzir da su elektroni rasuti molekulama zraka, EM zahtjeva visoki vakuum u području prodiranja snopa zračenja, što narušava očuvanje tekućeg uzorka. Same biološke molekule vrlo su osjetljive i na radijaciju, pri čemu vrlo lako može doći do pucanja kemijskih veza.² Prvi način kako molekule mogu izdržati visoki vakuum naziva se negativno bojenje (engl. negative stain). U principu biološki uzorci se oboje (engl. stain) niskokoncentriranom otopinom najčešće uranijevih soli i zatim stave sušiti prije stavljanja pod mikroskop. Neki nedostaci ove metode osim narušavanja nekih nestabilnih strukutra prilikom sušenja su i što je maksimalna rezolucija svega 15 Å te je nemoguće vizualizirati aminokiseline. Prednost joj je što radi snimke poprilično velikog kontrasta. Ova metoda se koristi još od 1970-ih i još uvijek se koristi za određivanje struktura manjih makromolekula (<250 kDa). Znanstvenici Henderson i Unwin, kao i Taylor i Glaeser te Dubochet i suradnici su svojim istraživanjima pokazali kako potpuno očuvani uzorci mogu biti snimljeni na način da ih se smrzne u tankom sloju nekristalnog oblika krute vode odnosno leda, nazvanim amorfnim ili staklastim ledom što je drugi način nošenja sa visokim vakuumom u mikroskopu. Ova metoda ne zahtjeva dehidraciju uzorka i koristi se za vizualizaciju proteina pa čak i DNA i RNA pri mnogo većim rezolucijama. S obzirom da se staklasti led održava u toj formi na temperaturama tekućeg dušika tehnika je dobila naziv 'cryo-EM'.¹

Rani eksperimenti i teorijska razmatranja sugerirali su da jednočestična krio-EM može dosegnuti atomsku rezoluciju za makromolekule mase manje od 100 kDa i ta se hipoteza smatrala preoptimističnom dugi niz godina. Najveći napredak je bio postignut za velike

ikozaedarske viruse. Godine 1997. jednočestična rekonstrukcija čestica jezgre virusa hepatitisa B riješila je strukturu zavojnica po prvi put. Za komplekse koji imaju elemente simetrije, 3D rekonstrukcija bi išla puno lakše i naravno brže. Mnogi pokušaji razvoja rekonstrukcija snimki asimetričnih kompleksa temeljio se na analiziranju negativno obojenih ribosoma 80-tih godina prošloga stoljeća.¹ Postupan razvoj ovih tehnika i njihova prilagodba za krio-EM dovela je do povećanje rezolucije od 40 Å kod strukture ribosoma sredinom 90-tih do 10 Å na prekretnici stoljeća.² Čak i nakon nešto više od desetljeća u 21. st. samo nekoliko krio-EM struktura sa jako malo ili nimalo simetrije je uspjelo dosegnuti rezoluciju između 7-9 Å. Pri toj rezoluciji α zavojnice su vidljive kao štapići, dok β strukture kao i bočni lanci aminokiselina nisu uočljivi. Nekoliko ključnih studija je pomoglo razvoju ove tehnike u zadnjih 50 godina.

1968. godine DeRosier i Klug koristili su snimke bakteriofaga T4 u negativu, što je česta metoda za 3D rekonstrukciju i detekciju orijentacije razdvojivih podjedinica u kompleksima i interakcija između molekula u kristalu, želeći pokazati kako je moguće izračunati 3D strukture iz 2D projekcija makromolekula koje zauzimaju različit smjer odnosno orijentaciju. Primjer slike u negativu nalazi se na slici 1.



Slika 1.³ Molekule E. coli glutamin sintetaze negativno snimljene na uranil acetatu.

1979. godine Taylor i Gleaser su pokazali, pomoću elektronske difrakcije, da je moguće dobiti informacije visoke rezolucije o biološkim uzorcima i pri tome izbjegnuti oštećenja nastala radijacijom stavljajući uzorak pod krio-zaštitu odnosno amorfni led.

1987. godine Dubochet i kolege razvijaju lako primjenjivu metodu za vitrifikaciju uzorka započevši tako eru krio-EM.

1990. godine Henderson i kolege otkrivaju prvu atomsku strukturu dobivenu elektronskom kristalografijom 2D kristala bakteriorodopsina.

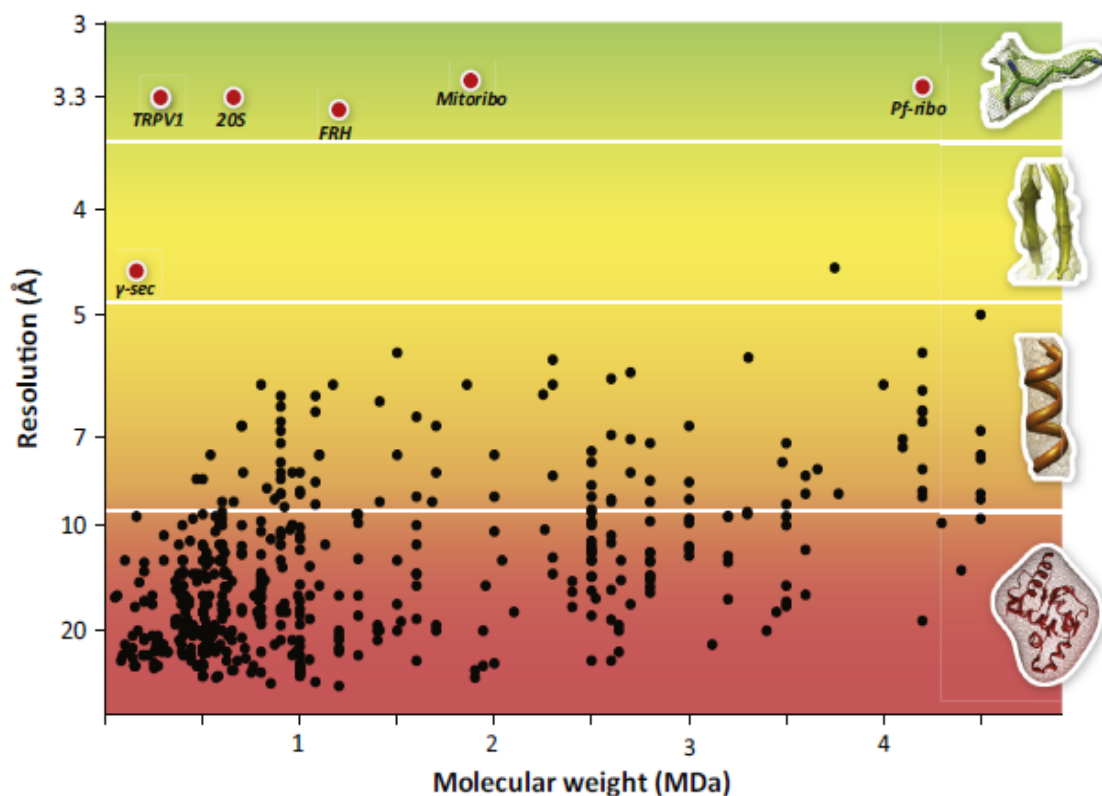
1995. godine Frank i kolege koriste jednočestičnu metodu rekonstrukcije za predlaganje modela translacije temeljenom na 25 Å krio-EM strukturi 70S ribosoma.

1997. godine Crowther i kolege probijaju rezoluciju od 10 Å na strukturi hepatitisa B koristeći jednočestičnu analizu čime je bilo moguće uočiti α zavojnice.

2005. godine Walz i Harrison koristeći elektronsku difrakciju visoke rezolucije dolaze do najveće rezolucije dosad od 1,9 Å u proučavanju akvaporina 0.

2010. godine Zhou i suradnici izradili su prvu atomsku strukturu jednog virusa (ljudski adenovirus) koristeći jednočestičnu krio-EM rekonstrukciju.

Od početka 2013. godine, napredak u krio-EM jednočestičnim analizama bio je toliko velik da je sama tehnika izazvala revoluciju. Napredak je najbolje vidljiv na grafu 1., gdje crne točkice predstavljaju strukture pohranjene u EMDB-u između 2000.-2012. godine, dok crvene točkice predstavljaju strukture dobivene razvitkom same tehnike krio-EM.



Graf 1.¹ Prikaz revolucionarnog napretka jednočestične krio-EM. Crne točke prikazuju strukture pohranjene u Electron Microscopy Data Base (EMDB) između 2000.-2012. godine.

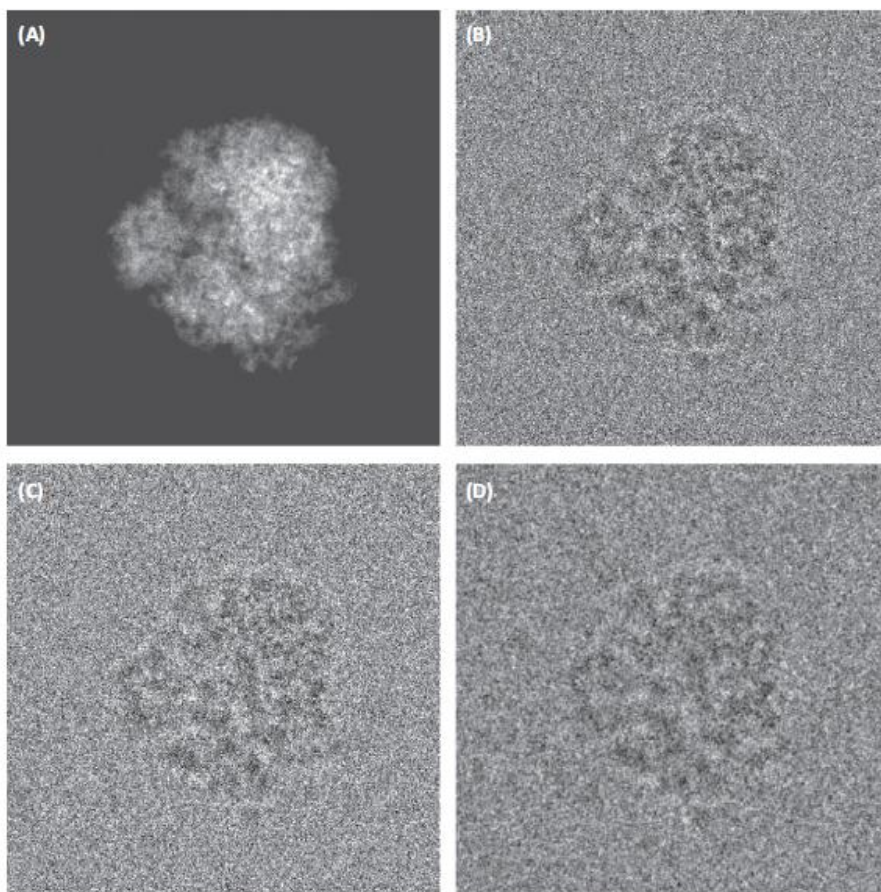
Crvene točke prikazuju strukture, odnosno napredak u tehnici, konkretnije u rezoluciji. Riječ je o strukturama γ -sekretaze (γ -sec), TRPV1 (membranski/kationski kanal), 20S proteasomu, F420 reducirajućoj (NiFe) hidrogenazi (FRH), velikoj podjedinici mitohondrijskog ribosoma kvasca (mito ribo) i citoplazamskog ribosoma *Plasmodium falciparum* u kompleksu sa emetinom (Pf-ribo)

Dok su ranije strukture riješile samo domene proteina (crveno obojano) i zavojnice (narančasto obojano), nedavne su strukture toliko detaljne odnosno rezolucija je tolika veća da se mogu uočiti β strukture kao što je (anti)paralelni niz aminokiselina (žuto obojano) ili bočni ogranci aminokiselina (zeleno obojano). Razlozi ovakvog 'naglog' napretka ove tehnike leže u unaprijeđenju elektronskih mikroskopa i postupaka obrade snimaka struktura, ali o tome nešto više u idućem poglavlju.²

2.2. Razvoj tehnologije za krio-EM

2.2.1. Direktni detektori elektrona (*direct-electron detectors*)

S obzirom da oštećenje uzorka zračenjem strogo ograničava broj elektrona koji se mogu koristiti, snimke krio-EM su poprilično mutne, a potrebno je otkriti dostupne elektrone što je moguće učinkovitije. Kvantna efikasnost detekcije (*detective quantum efficiency*, DQE) je mjera koliko je buke (engl. *noise*) dodano u odnosu na dolazni signal zbog pogrešaka u procesu detekcije. Cilj je imati što veći SNR (*Signal to Noise Ratio*). Što je veći SNR to je DQE bliže 1. Idealni detektor neće dodati nimalo buke i DQE mu iznosi 1, dok u praksi svi detektori dodaju nešto buke pa je i stoga DQE nešto manji od 1. Slika 2. prikazuje snimke ribosoma dobivenih krio-EM sa različitim DQE.¹



Slika 2.¹ Utjecaj DQE efekta na snimke nastale krio-EM. (A) Savršen projekcija ribosoma, (B) Prikaz iste snimke kao pod (A) sa savršenim detektorom, tj. DQE ovdje iznosi 1. Visoka razina buke proizlazi iz konačnog broja korištenih elektrona: 20 elektrona po \AA^2 u ovoj simulaciji, (C) Ista krio-EM snimka, ali s DQE uobičajenih, neidealnih detektora, (D) Ista snimka, ali s DQE koje imaju CCD (charge-coupled device) kamere. CCD kamere pretvaraju na svojoj površini elektrone u fotone i zatim detektiraju fotone što je još jedan izvor buke u krio-EM snimkama.

Sve do nedavno, fotografski film bio je vrsta detekcije za krio-EM visoke rezolucije i dugo nakon što je njegova uporaba pala u ostalim područjima moguće primjene. Glavni razlog široke uporabe je bio poprilično visok DQE efekt od $\sim 0,3$. Alternative, kao što su CCD kamere rade dobro pri niskim energijama, dok pri visokim energijama koje favorizira krio-EM DQE im padne na $\sim 0,1$. Bez obzira na to, ne zahtjevaju razvoj i skeniranje filma i mogu se povezati sa automatskim prikupljanjem podataka što im daje veliku prednost i razlog je današnje široke uporabe CCD kamera. Trenutno traženje prikladnih detektora sa visokim DQE konvergira prema uporabi monolitnih senzora sa aktivnim pikselima (monolithic active

pixel sensors, MARS). U ovim tkz. 'direktnim detektorima elektrona' elektron prolazi kroz tanak sloj ~ 10 nm poluvodičke membrane nakon čega polažu energiju koju detektiraju sustavi postavljeni direktno na membrani. Sa ovim detektorima, individualne pobuđene elektrone lako je uočiti. Postoji mogućnost da se elektroni u povratnoj difuziji vrate što dovodi do povećanja buke u snimkama i težeg detektiranja elektrona. Stoga novi detektori imaju sloj debljine svega 50 nm, pa gotovo svi elektroni mogu proći kroz sloj bez povratne difuzije. Glavni proizvođači ovakvih detektora su Direct Electron (DE), FEI (Falcon) i Gatan (K2). Drugi bitan napredak u razvoju krio-EM je u obradi dobivenih snimaka.^{1,4}

2.2.2. Napredak u obradi snimki u krio-EM

Dva bitna razvitka su zaslužna za napredak u obradi snimki kako bi se dobile bolje 3D rekonstrukcije. Prvi razvoj rješava poteškoće kod snimanja strukturno heterogenih uzoraka, dok se drugi odnosi na problem elektronskog zračenja čime se inducira pokretanje uzorka što nije dobro ako se želi dobiti kvalitetna rekonstrukcija. Većina uzoraka makromolekulskih kompleksa sadrži više od jedne jedinstvene 3D strukture zbog kompozicijske ili konformacijske heterogenosti. Ako projekcije drugačijih struktura nisu klasificirane pod strukturno homogene podskupove, njihova kombinacija u jedinstvenu 3D strukturu će rezultirati u najboljem slučaju mutnim mapama. Sami proces klasifikacije je poprilično zahtjevan jer je teško razlikovati projekcije različitih smjerova i projekcije različitih 3D struktura. Rani tkz. 'nadzirani' pokušaji 3D klasifikacije oslanjali su se na prethodno poznavanje strukturne varijabilnosti u uzorku, što nije općenito dostupno. Otkriće koje je omogućilo općenito primjenjivu nenadziranu 3D klasifikaciju došlo je od razvoja statističkih algoritama koji se temelje na postupcima traženja maksimalne vjerojatnosti. Uvođenjem ovog pristupa maksimalne vjerojatnosti u program RELION se pokazalo kao jak alat u 3D klasifikaciji i rekonstrukciji visoke rezolucije.

Drugi napredak u obradi snimaka usko je povezan sa napretkom detektora. Čim snop elektrona padne na tanki sloj amorfne leda, kemijske veze pucaju u uzorku. Iako ovakav pristup narušava praktički cijeli uzorak, sile uključene u procesu uzrokovati će gibanje unutar uzorka, što dovodi do zamućenja snimljenih slika na konvencionalnim CCD kamerama i fotografskom filmu. Niko Grigorieff i suradnici koristeći prototipove DE detektora su bili prvi

koji su iskoristili mogućnosti snimanja novih detektora kako bi okarakterizirali gibanje unutar uzorka izazvano snopom elektrona. Ubrzo nakon toga niz projekata na Sveučilištu u Kaliforniji u San Franciscu (UCSF) i Koncilu medicinskih istraživanja (Medical Research Council, MRC) u Cambridgeu dovelo je do napretka rezolucije rekonstruiranih karata. Na UCSF-u snimljene su čestice proteasoma 20S uz K2 detektor uz i predložen je algoritam za korekciju gibanja nastalog pod utjecajem elektronskog snopa kod velikih polja. Upotrebom 120 000 čestica, dobivena je mapa rezolucije 3,2 Å u kojoj su gotove svi bočni ogranci aminokiselina bili jasno vidljivi. Istovremeno, na MRC-u snimljeni su ribosomi uz Falcon kao detektor, i razvijen je algoritam za korekciju gibanja koji prati gibanja zasebnih čestica unutar tkz. Bayesovog okvira. Koristeći samo 35 000 čestica dosegnuta je rezolucija od 4 Å pri čemu su bili vidljivi detalji kao npr. bočni ogranci velikih aminokiselina. Ovo su prve dvije strukture koje su dale uvid u mogućnosti i potencijal otkrivanja struktura pomoću krio-EM uz korištenje novih detektora u kombinaciji sa korekcijom gibanja izazvanog snopom elektrona.^{1,5}

S jedne strane, snimke sa jačim signalima davale su i mape veće rezolucije. S druge strane, snimke sa manje šumova odnosno veće rezolucije omogućavale su algoritmima za obradu snimki bolji rad nego ikad prije. To je dovelo do više homogenih skupova snimaka sa manje magljenja izazvanog gibanjem unutar uzorka, čime se orijentacija svake čestice mogla preciznije odrediti.

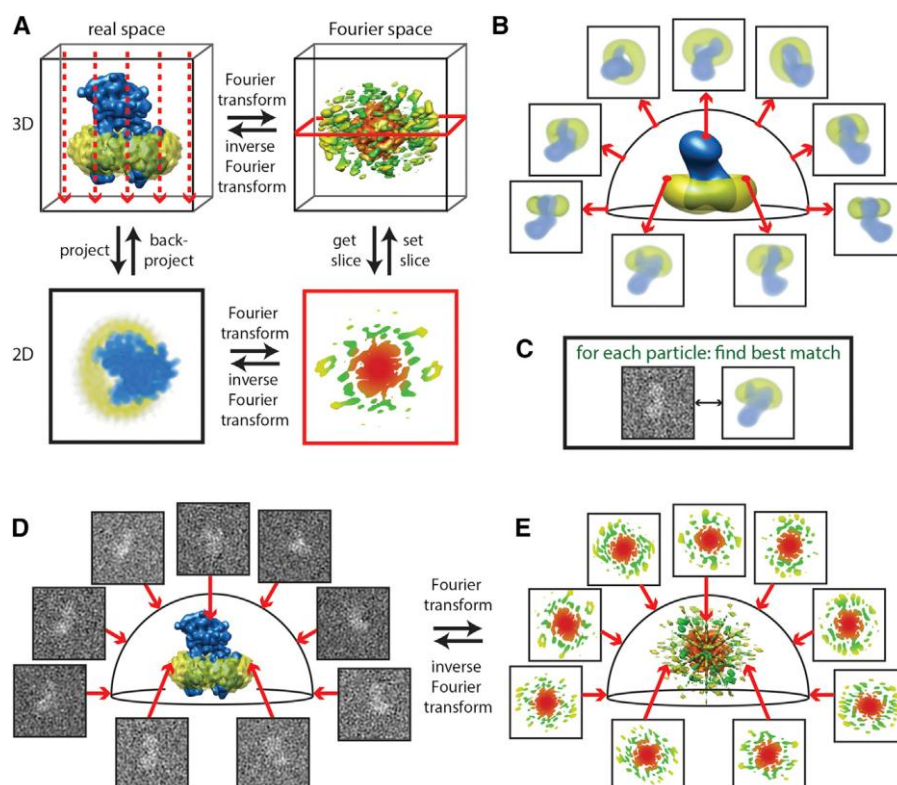
Pitanje koje se postavlja je koje su sad mogućnosti. U tablici 1. su sumirane sve krio-EM strukture pohranjene u EMDB do srpnja 2014. koje su dobivene koristeći nove detektore do rezolucije 5 Å. Ovo je samo jedan mali dijelić mogućnosti za strukturnu biologiju i njena istraživanja koje ova tehnika pruža.

Tablica 1.¹ Krio-EM jednočestične rekonstrukcije 3D struktura dobivene pomoću novih detektora direktnih elektrona do rezolucije od 5 Å (^a prikazane kao crvene točkice na grafu 1.)

Sample	EMDB entry	Release date	MW (MDa)	Point group	Detector	3D classification?	Beam-induced motion correction?	Software	Resolution (Å)	Refs
80S ribosome + emetine ^a	2660	Jun 2014	4.2	C1	Falcon	Yes	Yes	RELION [64]	3.2	[76]
Yeast mitoribosome (LSU) ^a	2566	Apr 2014	1.9	C1	Falcon	Yes	Yes	RELION	3.2	[71]
TRPV1 ^a	5778	Dec 2013	0.3	C4	K2	Yes	Yes	RELION	3.3	[69]
20S proteasome ^a	5623	May 2013	0.7	D7	K2	No	Yes	FREALIGN [87]	3.3	[53]
FRH ^a	2513	Feb 2014	1.2	T	Falcon	No	Yes	RELION	3.4	[70]
80S ribosome + CrPV-IRES	2599	May 2014	3.2	C1	Falcon	Yes	Yes	RELION	3.6	[81]
TRPV1 + DkTx + RTX	5776	Dec 2013	0.3	C4	K2	Yes	Yes	RELION	3.8	[68]
Dengue virus	2485	Nov 2013	50	I	Falcon	No	No	EMAN [88], MPSA [89]	4.1	[90]
80S ribosome + eIF5B	2421	Nov 2013	4.2	C1	Falcon	Yes	Yes	RELION	4.3	[79]
Rotavirus	5488	Sep 2012	35	I	DE	No	No	FREALIGN	4.4	[66]
γ-secretase ^a	2678	Jun 2014	0.17	C1	K2	Yes	Yes	RELION	4.5	[77]
80S ribosome	2275	Jan 2013	4.2	C1	Falcon	Yes	Yes	RELION	4.5	[67]
Sulfolobus turreted virus	5584	May 2013	75	I	Falcon	No	No	FREALIGN	4.5	[91]
Mammalian mitoribosome (LSU)	2490	Dec 2013	1.6	C1	Falcon	No	No	SPIDER, IMAGIC [92], RELION	4.9	[93]

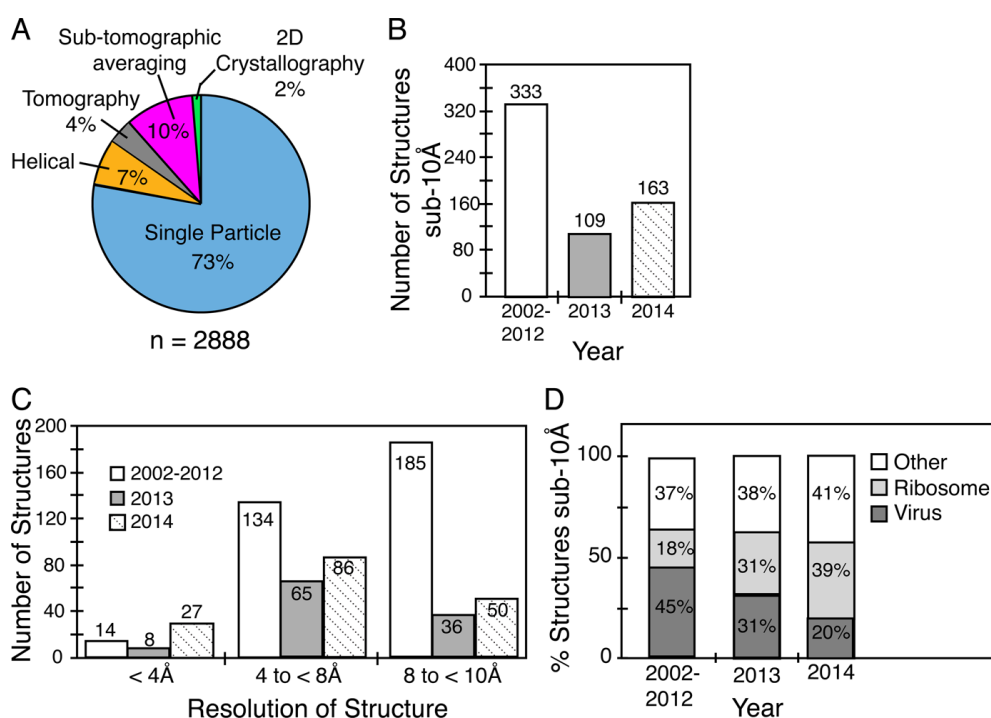
2.3. Krio - elektronska mikroskopija - jednočestična analiza (Single-particle cryo-electron microscopy)

Krio-elektronska mikroskopija koristi se za određivanje strukture proteina i makromolekulskih kompleksa bez potrebe za stvaranjem kristala ili uređenih nizova proteina. Iz tog razloga ova tehnika elektronske mikroskopije je korisna za određivanje struktura bioloških uzoraka koje treba pročistiti kako bi nastale velike, stabilne i homogene kristalne rešetke. Problem stvaraju heterogeni uzorci na čijoj se detekciji i 3D rekonstrukciji danas radi. Princip na kojem djeluje krio-EM jednočestična analiza prikazan je na slici 3.



Slika 3.² Pojednostavljeni koncept određivanja strukture krio-EM. (A) Teorem projekcija-ravnina kaže da 2D projekcija 3D objekta u stvarnom prostoru (lijevi dio) je ekvivalentno centralnoj 2D ravnini iz 3D Fourier transformacije tog objekta (desni dio). Smjer nastajanja projekcije u stvarnom prostoru (crvene strelice lijevo) je okomit na 2D ravninu iz Fourierove transformacije (crveni kvadrat desno); (B-E) Mnoge 2D projekcije mogu biti kombinirane u neku 3D rekonstrukciju kroz iterativni proces "podudaranje projekcija". Kako bi odredili relativne orijentacije svih eksperimentalnih projekcija, prvo se računa referentna projekcija 3D objekta u svim smjerovima (B), zatim dolazi do uspoređivanja svake eksperimentalne projekcije sa svim referentnim projekcijama kako bi našlo projekciju s kojom se najbolje podudara (C). To orijentira sve projekcije s obzirom na 3D strukturu (D). Teorem projekcija-ravnina zatim implicira da se 3D rekonstrukcija može izračunati pozicioniranjem svih 2D ravnina (2D Fourierovih transformacija svih eksperimentalnih projekcija) u 3D transformaciju (E) i računanjem inverzne transformacije. Ponavljanjem koraka (B-E) postepeno će se poboljšati orijentacije, a time i rezoluciju rekonstrukcije.

Nedavni napredak u tehnologiji detektora, mikroskopa i softvera omogućuju snimanje 3D mapa elektrosne gustoće u visokoj kvaliteti pri rezoluciji blizu atomske. Međutim, u usporedbi sa kristalografijom X zraka, krio-elektronska mikroskopija (KM) poprilično je mlada tehnika s različitim izazovima ispred sebe. Jednočestična elektronska mikroskopija tehnika je kojom se najviše struktura odredilo i pohranilo u EMDB (Electron Microscopy Data Base) u posljednjih 10-tak godina. (Slika 4.)



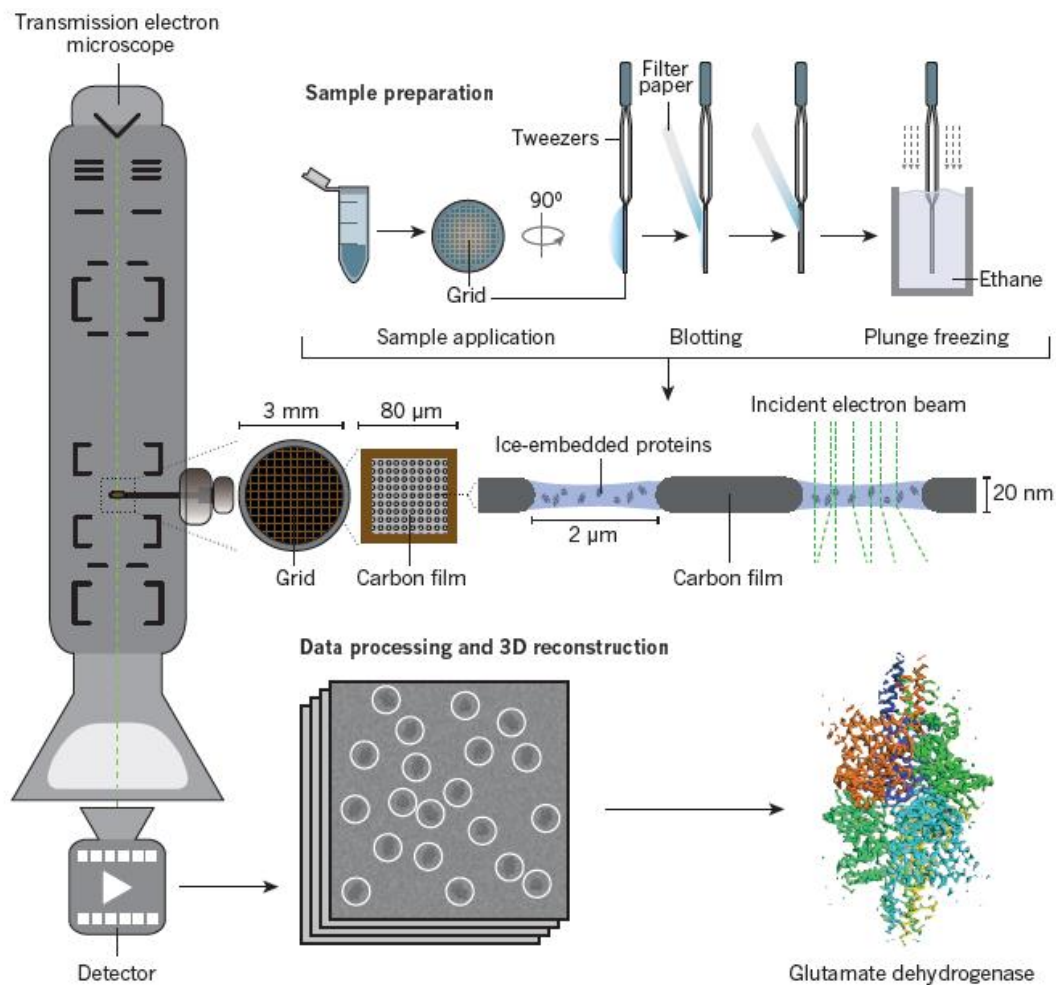
Slika 4.⁶ (A) Graf prikazuje postotak struktura pohranjenih u EMDB ovisno o tehnici kojom je struktura određena, (B) Prikaz broja struktura određenih jednočestičnom krio-EM do rezolucije subnanometra (<10 Å) pohranjenih u EMDB u posljednjih 12 godina, (C) Prikaz broja struktura određenih jednočestičnom krio-EM u rezolucijama manjim od 4 Å, između 4 i 8 Å, te između 8 i 10 Å pohranjenih u EMDB u posljednjih 12 godina, (D) Graf prikazuje koliki postotak (<10 Å) jednočestičnih krio-EM struktura pohranjenih u EMDB u zadnjih 12 godina su činili virusi, ribosomi te ostale biološke strukture.

Kako bi shvatili princip djelovanja krio-EM jednočestične analize, proći ćemo sve korake potrebne za 3D rekonstrukciju neke makromolekule, počevši od same pripreme uzorka preko same snimke i njenog obrađivanja, do 3D rekonstrukcije.

Da jednu stvar razjasnimo. Izraz krio-elektronska mikroskopija se može odnositi na tehniku 2D elektronske kristalografije, tehniku rekonstrukcije zavojnica, elektronsku tomografiju i jednočestičnu analizu. Među njima najkorištenija je analiza zasebnih čestica u amorfnom ledu odnosno jednočestična analiza.

2.3.1. Priprema uzorka za analizu

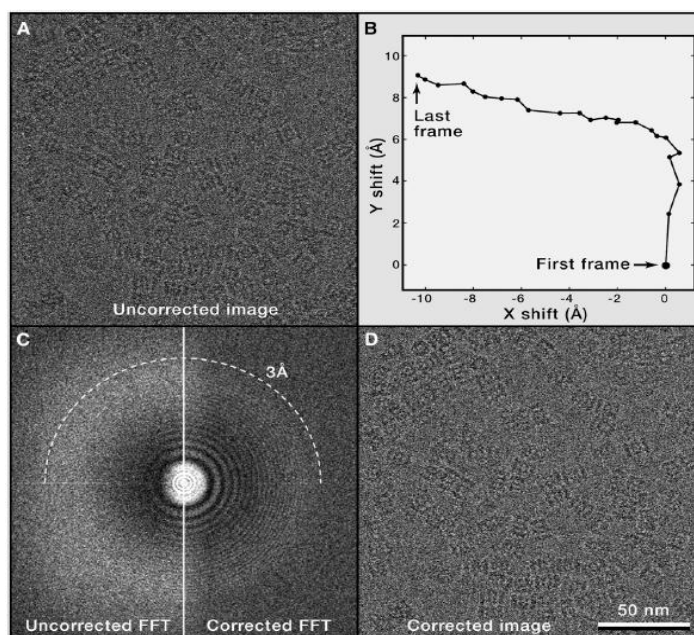
EM omogućuje direktnu vizualizaciju i 3D rekonstrukciju individualnih pročišćenih molekula ili kompleksa mase veće od ~ 100 kDa, dijelova tkiva, organela pa i cijelih stanica pod uvjetom da su dovoljno tanki ($\sim 1\mu\text{M}$) da kroz njih može proći snop elektrona.⁵ Prije nego sami uzorak može biti snimljen, mora biti dobro pripremljen kako bi izdržao vakuum (visok vakuum je potreban zbog jakih interakcija elektrona sa materijom) u elektronskom mikroskopu, što uzrokuje dehidraciju uzorka, te izloženost velikom broju elektrona pri čemu može doći do pucanja kemijskih veza (zato ova metoda snima uzorke sa dozom od $\sim 20 \text{ e}/\text{\AA}^2$ kako bi rezolucija ostala visoka), a time i narušavanja kompletne strukture. Uzorci korišteni u jednočestičnoj analizi obično se sastoje od pročišćenog biološkog uzorka na ugljikovom filmu sa potpornom strukturom. Potporna struktura je uglavnom bakrena rešetka dok ugljikov film može biti kontinuirani, koji se koristi za pripravu negativno obojenih uzoraka, ili ugljikov film sa rupicama kojeg koristimo u pripremi uzoraka u vitrificiranom, amorfnom ledu. Glavni problem kod EM rešetki je što su tanki ugljikovi filmovi nestabilni i loši vodiči pri niskim temperaturama što može rezultirati u smanjenoj kvaliteti snimke. Stoga se počelo raditi na unaprijeđenju vodljivosti EM rešetki, pa su im dodali silicijev karbid kao supstrat, a kako bi povećali mehaničku stabilnost koristilo se zlato.⁷



Slika 5.⁴ Određivanje strukture proteina krio-EM prikazano u tri koraka: priprema uzorka, skupljanje podataka i njihova obrada te na kraju 3D rekonstrukcija. Kao primjer je uzeta molekula glutamat dehidrogenaze

Za krio-EM mali alikvot uzorka u otopini ili suspenziji se nanosi na mrežu elektronskog mikroskopa, biva upijen u tanak sloj i odmah uronjen u tekući etan ($\sim -180^{\circ}\text{C}$) kako bi molekule bile zarobljene u tankom sloju vitrificiranog leda (Slika 5). Savršeni vitrificirani uzorak karakterizira tanki amorfni ledeni sloj, dovoljne debljine da smjesti čestice (ali opet ne toliko tanak kako bi sve čestice bile vidljive), te dobra raspoređenost čestica u vidnom polju koje mogu imati širok raspon orijentacija. Tanki sloj vitrificiranog leda omogućava jasno

uočavanje čestica (Slika 6), dok kristalni led osigurava snažnu strukturu tamnog kontrasta (savijene konture).⁷



Slika 6.⁷ Snimke krio-EM jednočestične analize sa korekcijom pokreta. (A) Tipična krio-EM snimka vitrificiranih čestica proteasoma 20S u tankom sloju vitrificiranog leda bez korekcije pokreta; (B) Određivanje traga gibanja u svim snimkama koristeći algoritam za korekciju gibanja svih kadrova snimanja (uočite kako se kretanje između kadrova smanjuje); (C) Lijevo: Spektar izračunat iz sume svih snimaka bez korekcije gibanja; Desno: Nakon korekcije gibanja. Korekcija gibanja vraća Thonove prstenove (isprekidani krugovi) do rezolucije od 3 Å; (D) Zbroj filmskih kadrova (movie frames) koji su pomaknuti prema pomacima u (B): Slike pod (A) i (D) se ne mogu razlikovati golim okom, ali je značajna razlika u kvaliteti Thonovih prstenova vidljivih u spektru snage.

Sloj leda bi trebao biti što je moguće tanji kako bi se postigao visoki kontrast između molekula i okolnog sloja leda te kako bi se smanjilo širenje defokusa zbog različite visine molekula u ledenom sloju što može spriječiti određivanje strukture u visokoj rezoluciji. Slojevi leda obično su tanji na rubovima i u sredini. Velike molekule kao npr. ribosomi ili virusi mogu se stoga isključiti iz središta sloja. Ovaj učinak je jači kod uzoraka koji sadrže detergent jer on smanjuje površinsku napetost, pa je i proizvodnja sloja leda puno teža. Ako je sloj leda poželjan za analizu, poželjne su ugljikove rešetke sa manjim rupicama.

Dobar vitrificirani uzorak pokazao je veliku gustoću molekula u različitim orijentacijama. Kako nekolicina molekula završi u rupama, problem koji se često susreće je da se vrlo mali broj molekula promatra u rupama ugljičnog filma. Veliki postotak molekula se izgubi tijekom upijanja (blotting) sa filter papirom, i u pripremi vitrificiranog uzorka koji zahtjeva puno veću koncentraciju početnog uzorka nego što ga zahtjeva tehnika negativnog bojanja (negative stain). Također nije neuobičajeno da se zapazi mali broj čestica u rupicama i kod velikih koncentracija uzoraka. Razlog ovog problema može biti da se molekule prvenstveno apsorbiraju na ugljikov film, pri čemu se miču iz rupica ili da se denaturiraju kad stupe u kontakt sa vodom/zrakom zbog površinske napetosti. Učinkovito rješenje problema gdje se molekule apsorbiraju za ugljikov film je da se uzorak nanese dva puta. Prvo nanošenje će zasititi ugljikov film proteinima, pa je više vjerojatno da više čestica ostane u rupama kada uzorak nanese drugi put. Alternativno, rešetke se mogu premazati tankim slojem ugljika, grafena ili lipidnim jednoslojem (monolayer) na koje će se zatim molekule adsorbirati. Kakogod, sve varijante potpornog filma osim grafena, će smanjiti kontrast slike/snimke, a sve tri varijante imaju sposobnost da potaknu molekule da zauzmu favorizirane orijentacije. Konačno, mreža može biti 'ukrašena' i samostalnim jednoslojem (monolayer), čime se smanjuje utjecaj jednog od tri dodana filma i time tjera molekule u rupice. Denaturacija proteina na sučelju zrak/voda može se riješiti debljim slojem leda (ovaj način smanjuje kontrast slike), upotrebom potpornog filma (smanjuje kontrast slike) ili 'kemijski popravljajući' uzorak prije vitrifikacije što može pak utjecati na strukturu.

Ponekad čestice zauzimaju preferirane orijentacije, vjerojatno zbog interakcija sa sučeljem zrak/voda. To stvara problem za rekonstrukciju 3D mapa gustoće, a rekonstrukcija zahtjeva više prikaza, ne samo jedan. Taj se problem može riješiti korištenjem debljeg sloja leda, dodatkom malih količina detergenta (spuštanje površinske napetosti sučelja zrak/voda), ili korištenjem potpornog filma na koje se molekule mogu adsorbirati i tako biti teže dostupne sučelju zrak/voda. Ako pak nijedan od ovih načina ne pomogne, moguće je (ali tehnički jako zahtjevno) prikupljanje slika nagnutih uzoraka, ali na ovaj način nećemo dobiti snimke velike rezolucije.⁷

2.3.2. Prikupljanje slika i njihova obrada za krio-EM jednočestičnu analizu

Određivanje strukture u jednočestičnoj analizi krio-EM zahtjeva slike visoke kvalitete (visoka rezolucija i kontrast) što je poprilično velik izazov bez obzira što današnji elektronski mikroskopi mogu dosegnuti rezoluciju od 2 Å. Za velike makromolekule potreban je što manji defokus pri prikupljanju slika jer veliki defokus pogoduje niskorezolutnom kontrastu slike dok mali defokus kako bi što više čestica bilo što bolje vidljivo. Korištenje velike doze elektrona povećava kontrast slike, ali pri tome štete svojom radijacijom kvaliteti slike. Stoga, kao što je i ranije napomenuto, doza elektrona za snimanje slike nekog uzorka koji se samo jednom izlaže snopu elektrona iznosi $\sim 20 \text{ e}^- / \text{Å}^2$. Treba uzeti u obzir i tip detektora koji koristimo. Za snimanje kada imamo film ili CCD kamere, obično se koristi snop elektrona visokog intenziteta jer je izloženost uzorka jako kratka (1 s ili manje). Kratka izlaganja uzorka su preferirana i kod korištenja DDD kamera koja također služe kod snimanja kada se uzorak izlaže samo jednom naletu snopa elektrona. Situacija je malo drugačija za DDD kamere koje broje elektrone. Kako bi se osiguralo točno brojanje elektrona, intenzitet snopa elektrona se mora smanjiti na ispod $\sim 10 \text{ e}^- / \text{sec}$ na kameri. Veći intenzitet bi jako utjecao na mogućnost točnog brojanja na taj način smanjujući DQE i kontrast same slike. Neke DDD kamere sadrže opciju snimanja filmova čime je više rezolucija dostupno. U ovom slučaju dolazi do snimanja niza kadrova koji mogu biti uravnoteženi ili poravnati kako bi se kompenziralo pomicanje uzorka inducirano snopom elektrona, čime se smanjuje zamagljenje slike (Slika 6). Nakon poravnanja slika se koristi za daljne određivanje strukture. Niz daljnjih koraka je potreban za potpunu interpretaciju i rekonstrukciju 3D strukture neke makromolekule, od korekcije za CTF (Contrast Transfer Function) mikroskopa, biranja pojedinačnih čestica uzorka i generiranja početne strukture, tretiranja strukturno heterogenih uzoraka, procjene rezolucije sve do interpretacije mape 3D gustoće. Također bitna stavka su i algoritmi koji sve to čitaju, a najčešći su SPIDER, EMAN2, FREALIGN, RELION i SPARX.^{4,5,7}

2.3.3. CTF parametri

Točna procjena CTF parametara je bitna za početnu procjenu kvalitete mikrografske slike i nadolazeće iščitavanje strukture. Parametri korišteni za računanje CTF-a su napon ubrzanja

(acceleration voltage), sferična aberacija, defokus, astigmatizam, i postotak amplitudnog kontrasta. Kada su određeni svi parametri može se nastaviti sa snimanjem strukture.⁷

2.3.4. Biranje čestica za određivanje 3D strukture

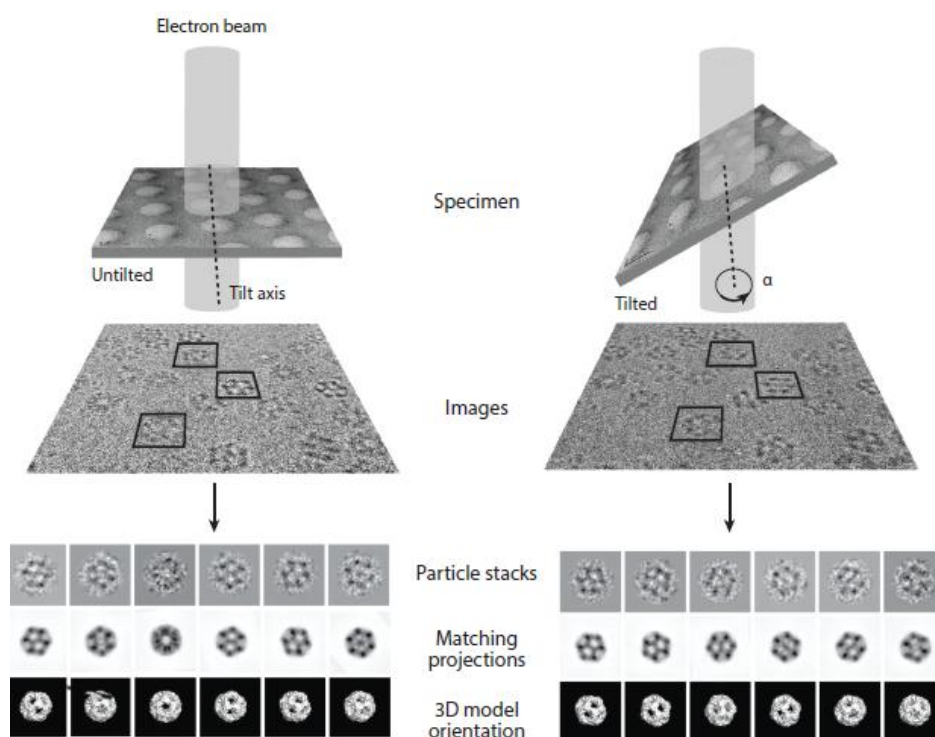
Nakon što smo prikupili set podataka, i prikupili dobre mikrografe (npr. bazirani na Thon prstenovima koji su vidljivi u visokoj rezoluciji u svim smjerovima) možemo nastaviti sa procesom biranja čestica. Kvaliteta izabranih čestica izrazito je bitna za kasnije procese, jer uključivanje loših čestica može spriječiti uspješno određivanje strukture makromolekula. Čestice se mogu birati 'ručno' (čovjek ih bira), polu-automatizirano ili potpuno automatizirano. Problem ili mana da bolje kažemo čovjeka je što se fokusira na bolje vidljive i njemu jasnije čestice pri tome izostavljajući rjeđe zastupljene orijentacije koje mogu biti iznimno potrebne za precizno određivanje strukture. Kod polu-automatiziranog pristupa, kompjuter započinje prvi korak detektiranja čestica u mikrografu, a korisnik uklanja loše čestice iz galerije mogućih kandidata. Automatsko biranje čestica općenito daju čestice u središtu njihovih prostora. Inače, čestice moraju biti centrirane prije poravnavanja (alignment) i klasificiranja, što daje prednost automatskom načinu biranja.^{5,7}

2.3.5. Klasificiranje snimki

Kako bismo razumjeli prvo skup prikupljenih podataka, korisno je poredati snimke u slične podskupove ili razrede kako bi generirali nekakav prosjek sa većim SNR (Sound to Noise Ratio) u odnosu na originalne snimke. Ovo se čini statističkom usporedbom svih slika, piksel po piksel, obično koristeći glavne komponente ili multivarijantnu statističku analizu kako bi se pronašle glavne varijacije unutar skupa podataka (naravno i za ovaj korak postoji softverski program koji ti čini za nas). Te glavne komponente se zatim koriste za klasifikaciju slika s obzirom na njihove osobine. Rezultirajući prosjek tih razreda može poslužiti kao referentna snimka u multi-referentnom poravnanju u kojemu su sve snimke korelirane ili bolje reći uspoređene sa svim referencama kako bi pronašli najbolje odgovarajuću referencu za svaku snimku i tako precizirali klasifikaciju. Ovi koraci se ponavljaju kako bi poboljšali sortiranje i poravnanje svih snimki.^{2,5,7}

2.3.6. Određivanje početne strukture makromolekule

Ako imamo slučaj u kojem imamo dobru raspoređenost orijentacija, imamo uvjete za stvaranje početne 3D rekonstrukcije. Jedna od takvih metoda je *ab initio* koja je vrlo izazovna, ali može pomoći u dobivanju početne strukture iz podataka dobivenih negativnim bojanjem (negative stain data) u kojemu su čestice jasno vidljive. Vrlo slično tome, korisno je imati i prosjek strukture iz svakog razreda u različitim orijentacijama kako bi se mogla napraviti početna 3D struktura. Jedan od problema kod *ab initio* tehnike građenja početne strukture je poravnanje kutova, a može se riješiti tako da se generira početni model na principu elektronske tomografije u kojoj se uzima niz pogleda istog dijela površine preko širokog spektra nagiba (npr. -60° do 60°). Primjer snimanja nagnutog i nenagnutog uzorka prikazan je na slici 7. Zbog nakupljanja velike doze elektrona i nedostajućeg dijela podataka upravo zbog ograničenja nagiba, rezolucija je ograničena, čineći taj pristup teže izvedivim za manje strukture.^{5,7}

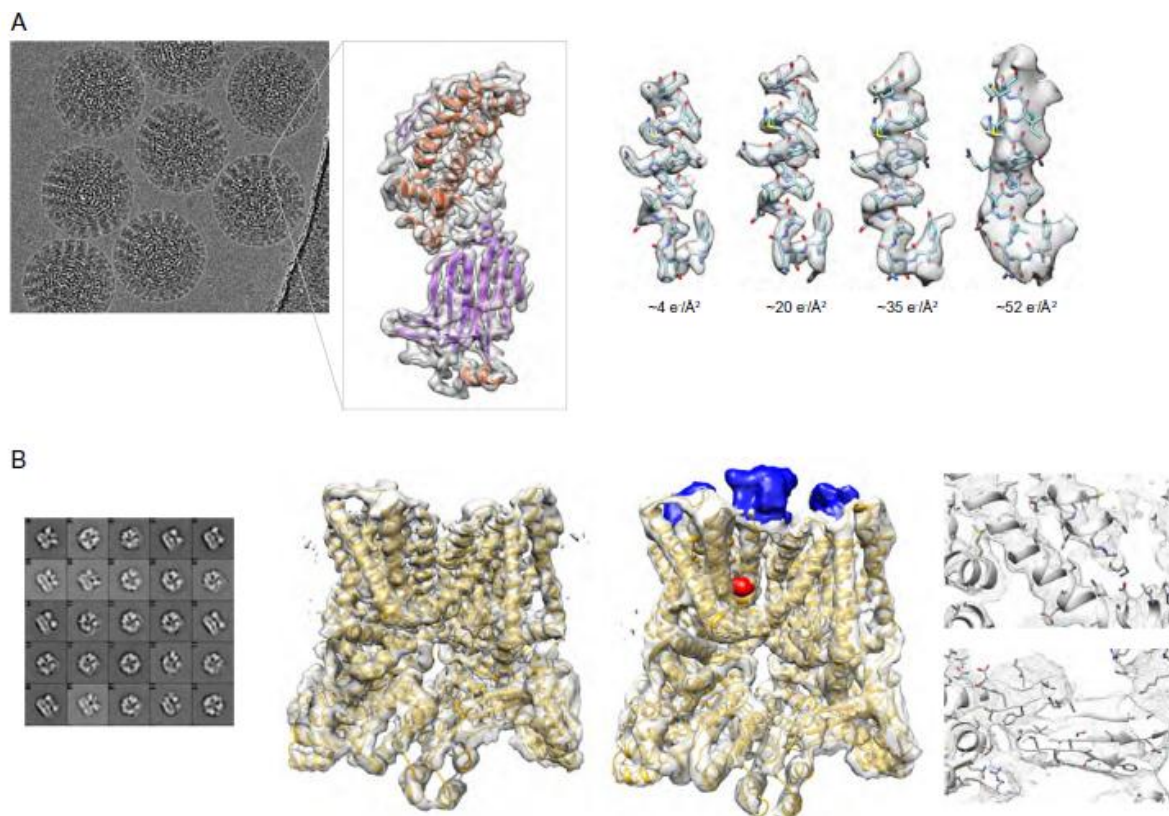


Slika 7.⁸ Snimanje na polju čestica uzorka koji nije nagnut (lijevo), i snimanje istog polja čestica, ali u slučaju kada je uzorak nagnut za kut α u odnosu na goniometarsku osnovicu (desno). Snimke čestica nenagnutog uzorka i nagnutog uzorka kompjuter odmah sprema u dva različita foldera nakon čega će isti napraviti i nekakav prosjek svih tih snimki. Odgovarajuće projekcije i povezane tehnike koriste se za prepoznavanje orijentacije nastalih snimki.

Slične tehnike rekonstrukcije 3D struktura, koje se smatraju hibridom između elektronske tomografije i jednočestičnog pristupa, se zovu slučajni konusni nagib (Random Conical Tilt, RCT) i rekonstrukcija ortogonalnog nagiba (Orthogonal Tilt Reconstruction, OTR). U RCT pristupu, snimaju se parovi slika. Jedna se snima pri nagibu između 45° i 60° , a druga bez nagiba. Ako snimljene čestice imaju dobru raspodjelu orijentacija, može se uzeti nekakav prosjek 3D struktura dobivenih RCT-om kako bi se generirao izotropski razlučen početni model. OTR se oslanja na dobru raspodjelu orijentacija da popuni nedostajuće podatke, i koristi nagibe od -45° i 45° .

Ab initio strukture se također mogu dobiti da se kompjuterski odrede relativne orijentacije čestica na temelju teorema zajedničke linije koji kaže da svaki par 2D projekcija neke iste 3D strukture ima barem jednu zajedničku 1D (liniju) projekciju. Ovaj princip je ugrađen u različitim programskim paketima i može se izvršiti u Fourierovu (EMAN, SIMPLE) prostoru i stvarnom (IMAGIC) prostoru, pri čemu se radije koristi prosjek snimki nego svaka snimka zasebno.

Ako je struktura povezana sa poznatom 3D strukturom, orijentacijski parametri mogu se odrediti podudaranjem projekcije, pri čemu reprojekcije strukture modela služe kao referentne za poravnanje seta podataka unakrsnom korelacijom (cross-correlation). Svakoj čestici se dodjeljuje orijentacija najbolje odgovarajuće reference. Nakon što su svim česticama dodjeljene orijentacije i rekonstrukcija 3D mapa, model se može precizirati ponavljanjem postupka sa zajedničkom linijom ili podudaranjem projekcija više puta.⁵



Slika 8.⁵ Primjeri krio-EM rekonstrukcija makromolekula; (A) Prosjek poravnatih snimljenih kadrova čestice rotavirusa sa dvostrukom membranom i 3D rekonstrukcija ekstrahiranih podjedinica. S desne strane su prikazani efekti oštećenja polipeptidnog lanca elektronskim snopom (manji snop, manja oštećenja); (B) Struktura ionskog kanala TrpV sa razrednim prosjecima s lijeve strane. Srednje dvije strukture prikazuju strukturu tog kanala bez i sa ligandom (crveno i plavo), i desno se nalaze α i β strukture umetnute u podjedinicu strukture.

2.3.7. Mjerenje rezolucije i interpretacija 3D mapa

Općenito interpretacija 3D mape ovisi o dosegnutoj rezoluciji. Mape niskih rezolucija (>10 Å) prikazuju opći oblik strukture i relativni raspored većih podjedinica, a rezolucija joj se provjerava RCT pristupom kojeg smo ranije naveli. Konačni rezultati mogu biti diskutabilni, ali je mogućnost velikih pogrešaka značajno umanjena. Kod mapa srednjih rezolucija (4-10 Å) jasno se vide sekundarne strukture i moguće je uočiti konformacijske promjene. Mapa srednje rezolucije može se potvrditi ako se podjedinica slažu sa podjedinicama dobivenih kristalografijom X zraka, naravno ako su iste dostupne. Drugi način je tzv. "test nagiba" gdje

se skupljaju parovi slika, pri čemu je jedna bez nagiba, a druga sa malim nagibom ($\sim 10^0$). Test zahtjeva projekcijsko podudaranje čestica iz parova slika sa EM mapom koju interpretiramo. Ako razlika između prikaza određenih za nagnut i nenagnut uzorak odgovara našem poznatom kutu kojeg smo odredili sami (npr. 10^0), onda se EM mapa smatra valjanom. I zadnje mape su one visoke rezolucije ($< 4 \text{ \AA}$) i u njima je moguće vidjeti elemente sekundarne strukture (npr. α zavojnice), bočne ogranke aminokiselina, te nam daju detaljan opis konformacijskih promjena makromolekule. Moguće je potkrijepiti rezoluciju mape vjerodostojnim atomskim modelom.

Interpretacija 3D mape ovisi o 3 faktora: rezoluciji mape, prisutnosti više konformacijskih stanja unutar uzorka i dostupnosti segmenata nekih od komponenti, cijelog kompleksa ili kompleksa njemu homolognog, a da su dobiveni kristalografijom X zraka. EM mape visoke rezolucije mogu biti analizirane na isti način kao i mape X zraka, primjenom *de novo* praćenja okosnice. Nadalje, moguće je doći do pouzdane atomske rezolucije čak i kad to nije bilo moguće kristalografijom ili je usporedba sa atomskim modelom bila preteška. Dostupnost strukture visoke rezolucije sa više mogućih konformacija čini krio-EM jednočestičnu analizu jedinstvenim sredstvom za proučavanje dinamike proteina. Mape srednje i niske rezolucije se interpretiraju na način da se spajaju sa segmentima dobivenih X zrakama. Međutim ovdje treba biti oprezan jer ako neki segment X zrake dobro pristaje u EM mapu ne znači da je to njegova i jedina lokalizacija odnosno mjesto, što otvara vrata velikoj mogućnosti pogreške.^{2,5}

2.4. Zaključak

Krio-elektronska mikroskopija je užasno važna tehnika u strukturnoj biologiji jer pomaže shvatiti kako proteini djeluju, odnosno povezati strukturu sa funkcijom. Područje krio-EM napreduje iz dana u dan i vrlo je vjerojatno da će biti još napredaka i usavršavanja u njenom djelovanju jer je i prostor za isti jako velik., počevši od detektora preko algoritama pa sve do interpretacija mapa. Bez obzira na svoju uzdižuću popularnost i šitoko područje mogućnosti koja ova tehnika nudi, ipak joj treba prići sa oprezom jer i ona ima svoje nesavršenosti. I na kraju za sve biokemičare, mikrobiologe i strukturne biologe, što se tiče određivanja struktura na atomskoj razini i shvaćanja mehanizma njihovog djelovanja, budućnost je svijetla.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. X. Bai, G. McMullan, and S.H.W Scheres: *How cryo-EM is revolutionizing structural biology*, Trends Biochem. Sci. (2015) **40**: 49-57.
2. E. Nogales and S.H.W. Scheres: *Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity*, Mol. Cell, (2015) **58**: 677-678
3. <http://what-when-how.com/molecular-biology/negative-stain-molecular-biology/> (datum pristupa 17. 08. 2017.)
4. R. Fernandez-Leiro and S.H.W. Scheres: *Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy*, Nature (2016) **537**: 339-346
5. M. Carroni and H. R. Saibil: *Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes*, Methods (2015) **95**: 78-85
6. E. Binshtein and M. D. Ohi: *Cryo-Electron Microscopy and the Amazing Race to Atomic Resolution*, Biochemistry (2015) **54**: 3133-3141
7. Y. Cheng, N. Grigorieff, P. A. Penczek and T. Walz: *A Primer to Single-particle Cryo-Electron Microscopy*: Cell (2015) **161**: 438-49
8. D. Elmlund and H. Elmlund: *Cryogenic Electron Microscopy and Single-Particle Analysis*, Annu. Rev. Biochem. (2015) **84**: 499-517